

Szenzoros neuropeptid felszabadulás farmakológiai gátlása, mint új gyógyszerhatás mechanizmus az asthma és a krónikus obstruktív légúti betegség terápiájában

A légúti gyulladásos megbetegedések prevalenciája, súlyossága és mortalitása az utóbbi időben növekvő tendenciát mutatott, kialakulásukban a kapszaicin-érzékeny, vagyis tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) receptort expresszáló szenzoros idegvégződéses jelentős szerepet játszanak. Ezek, az érzőidegek kb. 50%-át kitevő afferensek azért különlegesen, mert a klasszikus érző/fájdalomérző funkciójukon kívül lokális és szisztémás efferens funkciókkal is rendelkeznek. Aktiváció hatására a belőlük felszabaduló gyulladás- illetve, fájdalomkeltő hatású szenzoros neuropeptid, a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és tachykininek (pl. a P-anyag) az innervációs területen vazodilatációt és plazma protein extravazációt okoznak, továbbá jelentősen hozzájárulnak a leukocita infiltráció kialakulásához (neurogén gyulladás). Jelenleg az akut hörgőgörcs oldására jól beváltak a β_2 adrenerg receptor izgatók aeroszolban vagy porított formában inhaláltatva. A háttérben álló gyulladásos reakciók gátlására jelenleg a kortikoszteroidok állnak rendelkezésre, melyek hosszú távú alkalmazásakor, még lokális adás után is, számos mellékhatással kell számolnunk.

Az alábbiakban ismertetett kísérletei eredményeink a légúti gyulladásokban még kevésbé ismert neuroeffektor mechanizmusokat tártak fel, melyek alapján új hatásmechanizmú gyulladásgátló gyógyszerfejlesztésre nyílhat lehetőség.

1. Alkalmazott kísérleti modellek:

1.1. *In vitro* trachea perfúziós modell: A szenzoros neuropeptid (P-anyag, CGRP, szomatosztatin, PACAP-38) felszabadulását izolált patkány trachea mintákon vizsgáltuk. Az állatok leölését követően eltávolítottuk a teljes tracheákat. A szervfürdőkbe 2-2 tracheát helyeztünk és 37 °C-on 60 percig oxigenizált Krebs-oldattal perfundáltuk, majd a folyamatos áramlást 3 x 8 percre leállítottuk és így három analizálandó frakcióhoz jutottunk (pre-stimulált, stimulált, post-stimulált). A neuropeptid felszabadulás kiváltásához elektromos téringerlést végeztünk a 1200 impulzusal, a kémiai ingerlés során 10^{-6} M capsaicint alkalmaztunk. A három gyűjtött frakció P-anyag, CGRP, szomatosztatin és PACAP-38 koncentrációit saját fejlesztésű radioimmunoassay (RIA) módszereink segítségével határoztuk meg (Jakab és mtsai. 2004).

1.2. Endotoxinnal kiváltott szubakut intersticiális pneumonitisz modell: Lipopoliszaharid (60 µl, 167 µg/ml E. coli LPS) intranazális adása után 24 h-val elsősorban a peribronchiális/perivaszkuláris terekben alakul ki neutrofil/eozinofil granulocitás infiltráció, ödéma, makrofág felszaporodás és goblet sejt hiperplázia.

1.3. Ovalbuminnal (OVA) előidézett krónikus légúti gyulladás (asztma modell): Az egereket 20 µg ovalbumin i.p. injekciójával szenzitizáltuk a kísérlet 1. és 14. napján, majd a 28., 29. és 30. napokon 1%-os ovalbumin oldatot inhaláltattunk. Ennek következtében allergiás típusú krónikus légúti gyulladás jött létre, eozinofil/neutrofil sejtek és limfociták szaporodtak fel a bronchusokban és körülöttek, fokozott nyáktermelés és a csillószőrös hengerhám károsodása volt megfigyelhető.

2. Vizsgálati módszerek:

2.1. *In vivo* légzésfunkciós vizsgálatok szabadon mozgó és altatott egereken: Jelen OTKA támogatás és a Nemzeti fejlesztési Terv Gazdasági Versenyképesség Operatív Programjában (GVOP-3.2.1.-2004-04-0420/3.0) nyertes műszerpályázatok segítségével Buxco pletizmográf készülékeket vásároltunk és kialakítottunk egy komplex állatkísérletes légzésfunkciós vizsgálólaboratóriumot, amely lehetővé teszi számos légzésfunkciós paraméter vizsgálatát akut és krónikus légúti gyulladásmodellekben altatott és szabadon mozgó éber állatokban. A légúti hiperreaktivitást az LPS modellben 24 órával a gyulladás kiváltása után, az OVA modellben 4 héttel az első i.p. injekció után vizsgáltuk. A bronchokonstrikciót a muszkarin receptor agonista carbachol (5.5-44 mM) inhaláltatásával váltottuk ki.

- Légzésfunkciós paramétereket (enhanced pause: Penh, légzési frekvencia, légzési volumen) vizsgáltunk éber állatokban. A Penh a légúti ellenállással egyenesen arányos, számított érték. Ezen ismételhető, non-invazív módszerrel a bronchiális hiperreaktivitás kialakulása folyamatában volt vizsgálható.

- Légúti ellenállást mértünk direkt módon altatott állatokban.

2.2. Morfológiai vizsgálatok: Kvalitatív és szemikvantitatív értékelést végeztünk a hematoxin-eosinnal és perjódsav-Schiff festékekkel festett tüdőmetszeteken. Az LPS modellben a perivaszkuláris/peribronchiális oedema, granulocita akkumuláció, alveoláris makrofágok felszaporodása és nyáktermelő goblet sejtek hiperpláziája, az OVA modellben az mononukleáris sejtek és limfociták felszaporodása, a nyáktermelés fokozódása és a csillószőrös hengerhám károsodása alapján végeztünk pontozást patológus segítségével.

2.3. Biokémiai módszerek:

- Szenzoros neuropeptidek (P-anyag, CGRP, szomatosztatin és PACAP-38) plazma- és tüdőszöveti koncentrációit mértük saját fejlesztésű **RIA** módszerekkel.
- Az akkumulálódott granulociták mennyiségével egyenesen arányos myeloperoxidase (MPO) enzimaktivitást mértünk homogenizált szövetmintákból **spektrofotométerrel**.
- Gyulladásos citokin (IL-1 β , TNF- α) koncentrációkat határoztunk meg homogenizált tüdőszövetekből enzim-linked immunoassay (**ELISA**)-val és cytokine bead array (**CBA**)-val.

3. Eredmények

3.1. *In vitro* trachea perfúziós rendszerünkben a beszámolási időszakban összesen 94 új szomatosztatin agonista vegyületnek, (Biostatin Kft. Budapest) a P-anyag kapszaicin-érzékeny afferensekből történő felszabadulására kifejtett gátló hatásának vizsgálata történt meg. Ezek közül 17 ciklikus, stabil penta-vagy heptapeptid szerkezetű, 77 nem-peptid típusú vegyület volt, melyek közül 7, illetve 15 molekula bizonyult hatásosnak. A leghatásosabb 3-3 vegyület további *in vivo* gyulladásmodellekben történő vizsgálatát jelenleg is végezzük (az eredmények szabadalmi okokból még nem közölhetők, a molekulák előállítására vonatkozóan azonban szabadalmi beadvány történt: P-0400891/3/2004).

Ezen *in vitro* modellben a hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP-38) és a szelektív szomatosztatin 4 (sst₄) receptor agonista peptidomimetikum J-2156 (Juvantia Pharma, Turku, Finnország) izolált patkány tracheából kapszaicinnel, illetve elektromos téringerléssel kiváltott P-anyag, kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) és szomatosztatin felszabadulását koncentráció-függő módon gátolta (Németh és mtsai. 2006; Helyes és mtsai. 2006). A TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (prof. Uhtak Oh, Szöuli Egyetem) és SB366791 vegyületek, valamint a referencia anyagként alkalmazott kapszazepin azonban inkább csak a kapszaicinnel kiváltott neuropeptid felszabadulást gátolta, az elektromos téringerléssel kiváltottat nem (Jakab és mtsai 2005; Varga és mtsai 2005).

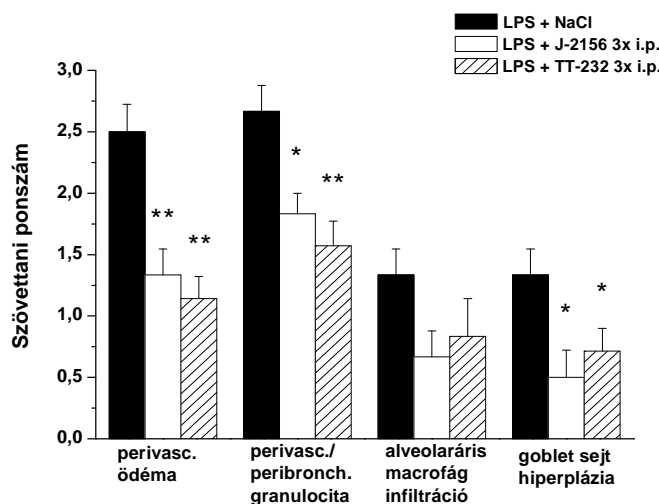
Elsőként mutattuk ki, hogy a PACAP-38 maga is képes felszabadulni az aktivált kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből *in vitro* és *in vivo* is patkányban, a szisztémás

keringésbe jutó PACAP-38-szerű immunoreaktivitás szelektív RIA módszerünkkel (Jakab és mtsai. 2004) nagy pontossággal meghatározható (Németh és mtsai. 2006; Helyes és mtsai. 2007, in press). E technikát humán plazmából történő PACAP-38 mérésre is adaptáltuk, ennek további (tudományos/klinikai) hasznosítása folyamatban van. Kifejlesztettük a PACAP másik, 27 aminosavból álló molekulaformáját mérő RIA-t is, amelyet jelenleg szöveti PACAP-27 meghatározásra használunk (Németh és mtsai. 2007, in press).

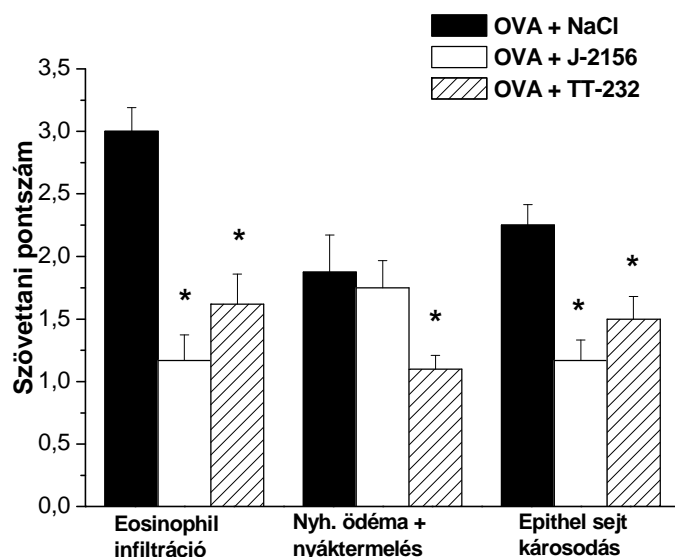
Kimutattuk továbbá, hogy ciszplatin-kiválotta neuropátiában a tracheából történő neuropeptid felszabadulás mértéke lecsökken, valamint a tracheo-bronhiális szenzoros neuropeptid receptor gén-expressziós kép megváltozik, jelentősen megnő az SSTR4 (szomatosztatin receptor 4) expressziója (Horváth és mtsai. 2005, 2006)

3.2. Endotoxinnal kiváltott szubakut légúti gyulladás egérmodellben funkcionális (légzésfunkciós mérés; Buxco teljes test pletizmográf), morfológiai (szemikvantitatív szövettani értékelés) és biokémiai (mieloperoxidáz enzimaktivitás mérés; citokin mérések ELISA-val) módszerekkel igazoltuk, hogy Tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1) kapszaicin receptor génhiányos egerekben fokozott gyulladás és következményes bronchialis hiperreaktivitás alakult ki. Direkt kémiai (szomatosztatin RIA) és sst receptor antagonistá ciklo-szomatosztatin kezeléssel funkcionális bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy a gyulladás során TRPV1 receptor aktivációval szomatosztatin szabadul fel a tüdő kapszaicin-érzékeny afferenseiből, amely a szisztémás keringésbe jut és gátolja a gyulladást és a következményes bronchokonstrikció hajlamot (Helyes és mtsai 2007, in press). Igazoltuk továbbá, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg végződés funkcionális inaktiválása (deszenzibilizáció) következtében fokozódik a gyulladás, de ennek ellenére csökkent légúti hiperreaktivitás tapasztalható. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a gyulladást okozó szenzoros neuropeptidok (P-anyag, CGRP) döntő szerepet játszanak a bronchokonstrikciós hajlam fokozódásában, de a gyulladás kialakulásában nem. Deszenzibilizált egerekben a gyulladás fokozódásáért a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló szomatosztatin hiánya a felelős (Elekes és mtsai. 2007, in press).

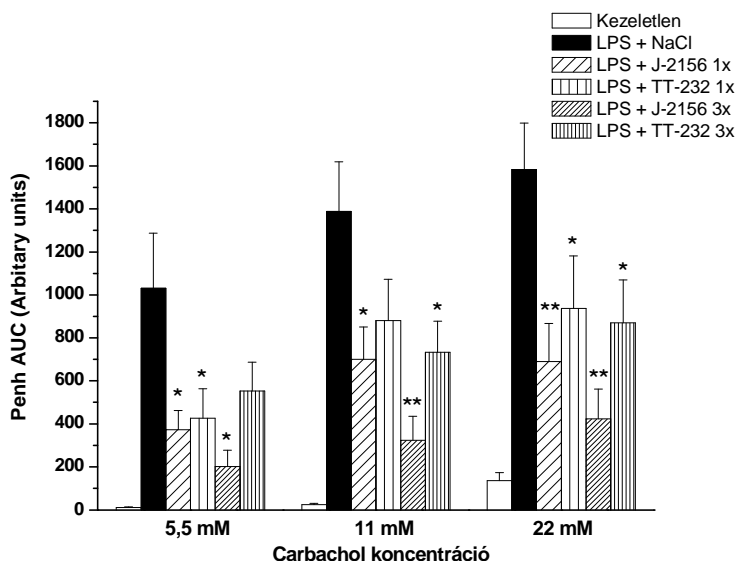
3.3. A fenti eredményeink alapján szintetikus sst₄ receptor agonisták vizsgálata történt az előbbieken ismertetett módszerekkel az LPS-indukálta pneumonitis és az ovalbuminnal kiváltott asztma modellekben egérben. A heptapeptid TT-232 (Biostatin) és peptidomimetikum J-2156 kódjelű vegyületek mindkét modellben hatékonyan gátolták a légúti gyulladást és a következményes hiperreaktivitást (Elekes és mtsai. 2007, közlésre elküldve).



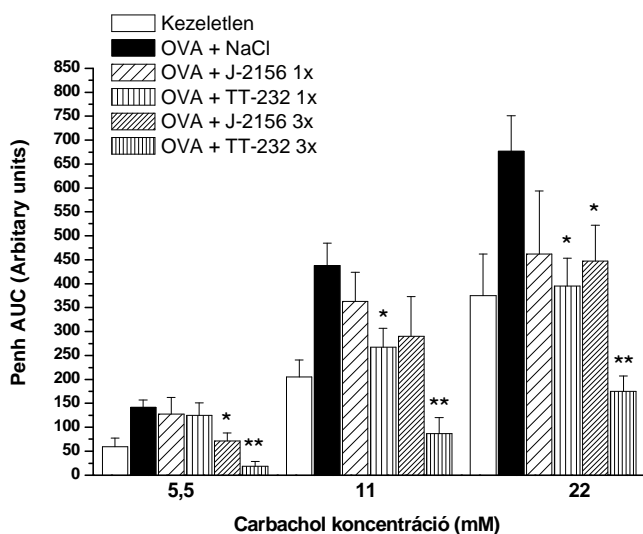
1. ábra. Tüdőmetsetek szemikvantitatív szövettani értékelése a perivaszkuláris ödéma, perivaszkuláris/peribronchiális granulocita akkumuláció, goblet sejt hiperplázia és az alveoláris mononukleáris sejtinfiltráció alapján. Minden oszlop 8-12 egér átlagát±az átlag standard hibáját mutatja; *p<0.01 J-2156 vagy TT-232-kezelt vs. NaCl-kezelt kontroll csoport (Mann-Whitney U test).



2. ábra. Tüdőmetsetek szemikvantitatív szövettani értékelése az eosinofil sejtek infiltrációja, nyálkahártyaduzzanat és nyáktermelés és az epihtel sejtek károsodása alapján. Minden oszlop 8-10 egér átlagát \pm az átlag standard hibáját mutatja; * $p<0.01$ J-2156 vagy TT-232-kezelt vs. NaCl-kezelt kontroll csoport (Mann-Whitney U test).



3. ábra. J-2156 és TT-232 (500 μ g/kg i.p.) gátló hatása az LPS-sel kiváltott légúti hiperreaktivitásra. A bronchokonstriktiót carbachol növekvő koncentrációinak porlasztásával váltottuk ki és szabadon mozgó egerekben Buxco teljes test pletizmográffal mértük. A válaszokat minden carbachol stimuláció után az enhanced pause (Penh) görbék alatti területek (PenhAUC) kiszámításával adtuk meg. Az egerek egy csoportjában a J-2156-t ill. a TT-232-t egyszer adtuk i.p. (500 μ g/kg) akutan, 20 perccel a mérés előtt, a gyulladás kialakulása után, míg más csoportokban e kezeléseket 3-szor alkalmaztuk a 24 órás gyulladásos reakció során. Minden oszlop 8-12 egér átlagát \pm az átlag standard hibáját mutatja; * $p<0.01$ J-2156 vagy TT-232-kezelt vs. NaCl-kezelt kontroll csoport (ANOVA + Bonferroni-féle módosított t-teszt).



4. ábra. J-2156 és TT-232 (500 µg/kg i.p.) gátló hatása az ovalbuminnal kiváltott légúti hiperreaktivitásra. A bronchokonstriktiót carbachol növekvő koncentrációinak porlasztásával váltottuk ki és szabadon mozgó egerekben Buxco teljes test pletizmográffal mértük. A válaszokat minden carbachol stimuláció után az enhanced pause (Penh) görbék alatti területek (PenhAUC) kiszámításával adtuk meg. Az egerek egy csoportjában a J-2156-t ill. a TT-232-t egyszer adtuk i.p. (500 µg/kg) akutan, 20 perccel a mérés előtt, a gyulladás kialakulása után. Más csoportokban e kezeléseket az első OVA injekció utáni 28., 29. és 30. napon, naponta 3-szor alkalmaztuk a gyulladás kiváltásával (OVA inhaláció) párhuzamosan. Minden oszlop 8-12 egér átlagát±az átlag standard hibáját mutatja; *p<0.01 J-2156 vagy TT-232-kezelt vs. NaCl-kezelt kontroll csoport (ANOVA + Bonferroni-féle módosított t-teszt).

4. Eredményeink gyakorlati hasznosíthatósága

A TRPV1 receptorok légúti gyulladásos folyamatokban és következményes hiperreaktivásban betöltött szerepének integratív módon: légzésfunkciós, morfológiai, biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata nagy előrelépést jelentett annak eldöntésében, hogy melyik célpont lehet ígéretes új típusú gyulladáscsökkentők, illetve antiasztmatikumok kifejlesztése céljából. Eredményeink bizonyították, hogy a TRPV1 receptor aktiváció védő hatású a légúti gyulladásos folyamatokban, az aktivációjával felszabaduló szomatosztatin közvetítésével. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a TRPV1 receptor gátlása nem, hanem sokkal inkább a szomatosztatin 4 receptor szelektív, stabil, elsősorban nem-peptid agonistákkal történő aktivációja jelenthet új terápiás perspektívákat a légutakat érintő gyulladásos betegségek kezelésében. Eredményeink gyakorlati jelentőségét hangsúlyozza az a tény, hogy a gyulladásos folyamatok neurogén komponensét, amely pl. az asztma patomechanizmusában is jelentős szerepet játszik, egyetlen forgalomban lévő gyógyszer sem képes megbízhatóan és hatékonyan gátolni.

Közlemények:

Elekes K., Helyes Zs., **Németh J.**, Sándor K., Pozsgai G., Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.:

Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse.

Regul. Peptides (2007. in press) (IF: 2.272)

Elekes K., Kereskai L., Pintér E., **Németh J.**, Szolcsányi J., Helyes Zs.:

Anti-inflammatory and bronchodilating effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists in murine airway inflammation models.

Eur. J. Pharmacol. (2007. submitted) (IF: 2.432)

Helyes Zs., Pintér E., **Németh J.**, Sándor K., Elekes K., Szabó Á., Pozsgai G., Keszthelyi D., Kereskai L., Engstrom M., Wurster S., Szolcsányi J.:
Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents.
Brit. J. Pharmacol. 149: 405-415, 2006. (IF: 3.410)

Helyes Zs., Pozsgai G., Börzsei R., **Németh J.**, Bagoly T., Pintér E., Elekes K., Szolcsányi J., Reglődi D.:
Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat.
Peptides (2007. in press) (IF: 2.231)

Helyes Zs., Elekes K., **Németh J.**, Pozsgai G., Sándor K., Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.:
Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse.
Am. J. Physiol. (2007. in press) (IF: 3.940)

Horvath P., Szilvassy J., **Németh J.**, Peitl B., Szilasi M., Szilvassy Z.:
Decreased sensory neuropeptide release in isolated bronchi of rats with cisplatin-induced neuropathy.
Eur. J. Pharmacol. 507: 247-252, 2005. (IF: 2.432)

Horváth P., Szivássy Z., Peitl B., Szilvássy J., Helyes Zs., Szolcsányi J., **Németh J.**:
Changes in tracheo-bronchial sensory neuropeptide receptor gene expression pattern in rats with cisplatin-induced sensory neuropathy.
Neuropeptides 40: 77-83, 2006. (IF: 2.494)

Jakab B., Reglődi D., Józsa R., Hollósy T., Tamás A., Lubics A., Lengvári I., Oroszi G., Szilvassy Z., Szolcsányi J., **Németh J.**:
Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay.
J. Biochem. Biophys. Meth. 61: 189-198, 2004. (IF: 1.302)

Jakab B., Helyes Zs., Varga A., Bölcskei K., Szabó Á., Sándor K., Elekes K., Börzsei R., Keszthelyi D., Pintér E., Pethő G., **Németh J.**, Szolcsányi J.:
Pharmacological characterization of the TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) in vitro and in vivo in the rat.
Eur. J. Pharmacol. 517: 35-44, 2005. (IF: 2.432)

Németh J., Reglődi D., Pozsgai G., Szabó Á., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.:
Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice.
Neuroscience 143: 223-230, 2006. (IF: 3.410)

Németh J., Jakab B., Józsa R., Hollósy T., Tamás A., Lubics A., Lengvári I., Kiss P., Oberitter Zs., Horváth B., Szilvassy Z., Reglődi D.:
PACAP-27 radioimmunoassay: Description and application of a novel method.
J. Radioanal. Nucl. Chem. (2007. in press) (IF: 0.460)

Varga A., **Németh J.**, Szabó Á., McDougall J.J., Zhang C., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.:

Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. Neurosci. Lett. 385: 137-142, 2005. (IF: 2.019)

Szabadalom:

Szolcsányi J., Kéri Gy., Wáczek F., Örfi L., Ointér E., Helyes Zs., Szűts T., **Németh J.**:
7H-pirrol[2,3-*d*]pirimidin származékok, illetve gyógyászatilag elfogadható sóik, ezt tartalmazó gyógyászati készítmények és eljárás a hatóanyag előállítására.
P-0400891/3/2004 (Magyarország)